

Process for preparing full-function helper virus used for production of recombinant adeno-associated virus and its usage

Patent number: CN1243878
Publication date: 2000-02-09
Inventor: WU ZHIJIAN (CN); WU XIAOBIN (CN); HOU YUNDE (CN)
Applicant: NAT PRIORITY LAB OF VIRUS GENE (CN)
Classification:
- international: C12N7/01; C12N15/63; C12N15/66; C12N7/01; C12N15/63; C12N15/66; (IPC1-7): C12N15/66; C12N7/01; C12N15/63
- european:
Application number: CN19981020033 19980924
Priority number(s): CN19981020033 19980924

[Report a data error here](#)

Abstract of CN1243878

The present invention relates to a process for preparing the recombinant herpes simplex virus (HSV1-rc) loaded with the gene of 2-type adeno-associated virus (AAV-2) rep-cap and its application in the production of recombinant adeno-associated virus (rAAV). Said recombinant herpes simplex virus can provide all help functions needed by replicating rAAV plasmid in cells and packing it to become toxic rAAV plasmid, and can be used to prepare a lot of rAAV. The generation of HSV1-rc is based on the reformation of a set of viscose plasmids containing full gene group of HSV1 virus. At first, the recombinant DNA technique is used to insert AAV-2 rep-cap gene into HSV-1 gene group of one viscose plasmid. The skeleton parts of said recombinant viscose plasmid and associated 4 ones are cut out by enzyme. The HSV11 sensitive cell is cotransfected by liposome method, 5 HSV1 sections take part in homologous recombination in cell to generate HSV1-rc, which is used to infect the transfected cell or the cell spawn stably carrying rAAV carria plasmid to generate a lot of infective toxic rAAV plasmids.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl⁷

C12N 15/66

C12N 15/63 C12N 7/01

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98120033.8

[43]公开日 2000年2月9日

[11]公开号 CN 1243878A

[22]申请日 1998.9.24 [21]申请号 98120033.8

[71]申请人 病毒基因工程国家重点实验室

地址 100052 北京市宣武区迎新街100号基因室

[72]发明人 伍志坚 吴小兵 侯云德

权利要求书1页 说明书4页 附图页数3页

[54]发明名称 用于重组腺伴随病毒生产的全功能辅助病毒的产生及其用途

株，就能产生大量有感染性的rAAV毒粒。用这种方法产生的rAAV能将外源基因导入哺乳动物细胞中并表达。

[57]摘要

本发明包括了一种装载了2型腺伴随病毒(AAV-2)rep-cap基因的重组单纯疱疹病毒(HSV1-rc)的产生方法及其在重组腺伴随病毒(rAAV)生产中的用途。这种重组单纯疱疹病毒能提供rAAV质粒在细胞内复制和包装成rAAV毒粒所需的全部辅助功能，并能用于rAAV的大量制备。HSV1-rc的产生是在对一套含有HSV1病毒全基因组的粘性质粒(Set C粘粒，包括cos6, cos14, cos28, cos48, cos56)进行改造的基础上实现的。首先，用重组DNA技术将AAV-2 rep-cap基因插入基中一个粘粒的HSV-1基因组中，例如插入cos6的HSV1 UL2基因中构建成cos6-rcΔUL2；插入cos56的HSV1 UL44基因中构建成cos56-rcΔUL44。然后，将插入了rep-cap的重组粘粒与相应的其余4个粘粒经酶切切去粘粒骨架部分后用脂质体方法共转染HSV11敏感细胞如BHK-21,5个HSV1片段在细胞中发生同源重组而产生HSV1-rc。用HSV1-rc感染rAAV载体质粒转染的细胞或稳定携带rAAV载体质粒的细胞

ISSN 1008-4214

权 利 要 求 书

本发明属于病毒基因工程领域，具体涉及大量生产重组腺伴随病毒(rAAV)所需的复制和包装功能系统。本发明涉及一种装载了2型腺伴随病毒(AAV-2)rep-cap基因(4.3kb)的重组单纯疱疹病毒(HSV1-rc)的产生方法及其在重组腺伴随病毒(rAAV)生产中的用途。

1. 本发明提出的能提供rAAV复制和包装所需的全部功能的辅助病毒HSV-rc的制备策略，其特征在于，通过对一套含有HSV-1全基因组的粘粒(SetC)进行基因操作，将rep-cap基因插入到在HSV-1基因组片段中，然后将其与其余4个粘粒共转染细胞，获得含有rep-cap的重组HSV-1。该重组病毒既能作为产生rAAV所需要的辅助病毒功能，又能提供rep-cap基因的功能，因此是一种生产rAAV的全功能辅助病毒。
2. 本发明所构建的2种HSV-rc，其特征在于rep-cap基因分别插人在HSV-1 UL2基因(编码尿嘧啶DNA糖基化酶)和HSV-1 UL44基因(编码糖蛋白C)的XbaI位点，获得的重组病毒分别称为HSV-rc/ΔUL2和HSV-rc/ΔUL44。
3. 在粘粒所载的HSV-1基因组片段中插入rep-cap基因。利用cos6及cos56粘粒所装载的HSV-1基因组片段中各有一个XbaI单酶切位点(分别位于UL2和UL44基因内)的特点，用XbaI将rep-cap基因从pSub201中切出，分别插入cos6及cos56的XbaI位点中(插入方向不限定)，构建成重组粘粒cos6-rcΔUL2及cos56-rcΔUL44。两种重组粘粒均寄存于大肠杆菌DH5 α 株(MAX EFFICIENCY DH5 α , GIBCO#18258-012)中。含此两个重组粘粒的菌株已于1998年9月24日保存于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心，登记人册编号为CGMCC No.0361-1,2。
4. 根据权利1、2、3，通过对含有HSV-1全基因组的一套粘粒进行基因操作，可将rep-cap插入HSV-1基因组的其它部位，生成插入部位不同的重组HSV-rc。
5. 根据权利要求1、2、3，可在在2个以上部位插入rep-cap基因的重组HSV-1病毒。
6. 用本发明的HSV-rc重组病毒感染含有rAAV载体元件的细胞株生产rAAV的方法。

说 明 书

用于重组腺伴随病毒生产的全功能辅助病毒的产生及其用途

说 明 书

本发明属于病毒基因工程领域，具体涉及大量生产重组腺伴随病毒(rAAV)所需的复制和包装功能系统。本发明涉及一种装载了2型腺伴随病毒(AAV-2)rep-cap基因(4.3kb)的重组单纯疱疹病毒(HSV1-rc)的产生方法及其在重组腺伴随病毒(rAAV)生产中的用途。这种重组单纯疱疹病毒能提供rAAV质粒在细胞内复制和包装成rAAV毒粒所需的全部辅助功能，并能用于rAAV的大量制备。HSV1-rc的产生是在对一套含有HSV1病毒全基因组的粘性质粒(Set C 粘粒，包括cos6,cos14,cos28,cos48,cos56)进行改造的基础上实现的。用HSV1-rc感染rAAV载体质粒转染的细胞或稳定携带rAAV载体质粒的细胞株，就能产生大量有感染性的rAAV毒粒。用这种方法产生的rAAV能将外源基因导入哺乳动物细胞中并表达。

腺伴随病毒(adeno-associated virus, AAV)是微小病毒科(parvovirus)成员，其基因组为4682个核苷酸组成的单链DNA。AAV是依赖性病毒，需要其它病毒如腺病毒或单纯疱疹病毒，或辅助因素提供辅助功能才能复制。在没有辅助病毒存在时，AAV感染细胞后其基因组将整合到细胞染色体中成为潜伏状态，而不产生子代病毒。

AAV-2的全长基因组已克隆至大肠杆菌质粒中。其中含有2个各145bp长的倒转末端重复序列(Inverted terminal repeat,ITR)。它们是AAV基因组的复制起点，并与AAV复制、整合或包装等功能有关。其基因组其余部分可分为2个功能区，rep基因区和cap基因区。rep基因有4种不同的形式的产物：Rep78, Rep68, Rep52, Rep40。它们为AAV复制和病毒基因表达等所必需的调节蛋白。cap基因编码3种结构蛋白，VP1, VP2, VP3，共同组装成AAV病毒的外壳。rep和cap基因编码的蛋白在AAV产毒性复制中都是反式作用蛋白。

AAV被认为是基因治疗理想的候选载体之一。许多实验室都构建了能将外源基因导入细胞的rAAV病毒。AAV载体质粒的主要结构特征是将rep-cap基因从病毒基因组中切除，代之以所需的DNA片段。

产生rAAV病毒的经典方法为将rAAV载体质粒与含有rep-cap基因的辅助质粒导入腺病毒或单纯疱疹病毒感染的细胞中。2-3天后从培养上清及病变的细胞中即可收获到rAAV病毒，同时还含有所用的腺病毒或单纯疱疹病毒。腺病毒和单纯疱疹病毒都可用热处理(55℃ 30分钟至2小时)而灭活，但不影响AAV病毒的活性。

虽然这种生产rAAV病毒的方法比较简单，但仍存在许多明显的缺点。首先，每次制备rAAV病毒时都需要转染细胞。由于转染方法自身的限制，转染及其转染效率较低，是产生rAAV病毒滴度较低的原因之一。而且，用转染方法目前还难以大规模转导细胞，因此不适应大量生产rAAV病毒的需要。因此，有必要研究一种能用于大量生产rAAV病毒的系统和方法。

颜子颖等1996年曾申请名为“能用于包装重组腺病毒伴随病毒的单纯疱疹病毒载体及其

说 明 书

用途”的发明专利(中国专利申请号 96120549.0, 公开号 CN 1159480A)。该专利介绍了一种将 AAV-2 rep-cap 基因置于 HSV1 扩增子载体质粒, 构建成 pHSV-AAV(+/-)。将该质粒导入细胞中, 在 HSV-1 野生型病毒的存在下, 可获得一种野生型 HSV-1 和含 rep-cap 基因的假病毒的混合病毒, 该混合病毒具有提供 rAAV 病毒复制和包装的全部辅助功能。最近 Conway 等 (Conway JE et al, Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing rep and cap J. Virol. 71(11): 8780-8789, 1997) 也报道了类似的研究。但是, 这种混合病毒中假病毒所占的比例较小(<10%), 所能提供的辅助功能有限; 并且假病毒与野生型病毒的比例在病毒传代中不固定, 不利于大量生产的质量控制。

~~本发明的目的在于提供用于简便而大量生产 rAAV 病毒的技术方法和全功能辅助病毒 HSV-rc。本发明的目的是通过提供含有 rep-cap 基因的重组粘粒及其构建方法、HSV-rc 病毒及其构建方法及用 HSV-rc 生产 rAAV 病毒的方法而实现的。~~

本发明提出的全功能辅助病毒 HSV-rc 为重组的 HSV-1 病毒, 其特征在于在 HSV-1 基因组中插入了一个拷贝的 rep-cap 基因(4.3kb, 方向不限定)。本发明所构建的 2 种 HSV-rc 中, rep-cap 基因分别插在 HSV-1 UL2 基因(编码尿嘧啶 DNA 糖基化酶)和 HSV-1 UL44 基因(编码糖蛋白 C)的 XbaI 位点中, 分别称为 HSV-rc/ΔUL2(图 1a)和 HSV-rc/ΔUL44(图 1b)。UL2 和 UL44 基因产物对于 HSV-1 在体外培养细胞中的增殖和传代不是必需的。这 2 种重组 HSV1 病毒均可以在 HSV 敏感细胞(如 BHK-21)中增殖和稳定传代。

本发明所产生的 HSV-rc 病毒是通过对一套含有 HSV1 病毒全基因组的粘性质粒(Set C 粘粒, 包括 cos6,cos14,cos28,cos48,cos56)(Conningham C, Davision AJ. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. Virology, 1993, 197: 116-124) 进行改造的基础上产生的。首先, 用重组 DNA 技术将 AAV-2 rep-cap 基因插入其中一个粘粒所含的 HSV-1 基因组中。然后, 将插入了 rep-cap 的重组粘粒与相应的其余 4 个粘粒经酶切去粘粒骨架部分后用脂质体方法共转染 HSV1 敏感细胞如 BHK-21, 5 个 HSV-1 片段在细胞中发生同源重组而产生重组病毒。

用这种重组 HSV1 病毒感染含有报告基因 GFP(绿色荧光蛋白基因)的 rAAV 载体质粒转染的细胞, 获得的细胞裂解液上清用于感染培养的哺乳动物细胞, 在荧光显微镜下(激发光波长 490nm)可见到大量的绿色细胞。表明产生的 rAAV 病毒具有感染性, 并能将外源基因导入细胞中表达。

本发明在 pBDZ(+)质粒(中国专利申请号 97116981.0)的基础上构建成含有 GFP 基因的重组质粒 pEBUF5。将该质粒导入 293c18 细胞(ATCC CRL10852, F9766, 该细胞中含有并表达 EBV 病毒的 EBNA1 基因), 获得的 HygromycinB 抗性细胞株命名为 293c18/EBUF5。用 HSV1-rc 病毒感染稳定携带 rAAV 载体质粒 pEBUF5 的细胞株 293c18/EBUF5, 可方便地产生大量有感染性的 rAAV/GFP 病毒, 该方法可实现 rAAV 病毒批量生产。

本发明用于构建重组病毒 HSV-rc 的原始生物材料有:

Set C 粘粒: 由依次分载了 HSV-1 病毒全基因组的 5 个粘粒组成: cos6, cos14, cos28, cos48,

说 明 书

cos56 (Conningham C, Davision AJ. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. Virology, 1993, 197: 116-124)。为 Davision AJ 赠送。该套粘粒中装载的每一 HSV-1 病毒基因组片段的末端与装载于另一粘粒中的 HSV-1 片段的末端序列重复，这是 5 个 HSV-1 基因组片段在细胞中发生同源重组的基础。

pSub201 : Samulski et al, A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication。

HSV-rc 重组病毒的制备方法：

采用与制备 HSV1-lacZ100 重组病毒(吴小兵等, 中国专利申请号 98101753.3) 相同的策略和方法。

cos6 及 cos56 粘粒中的装载的 HSV-1 基因组片段中各有一个 XbaI 单酶切位点，分别位于 UL2 和 UL44 基因内。用 XbaI 将 rep-cap 基因从 pSub201 中切出，分别插入 cos6 及 cos56 的 XbaI 位点中，构建成重组粘粒 cos6-rcΔUL2 (图 2a) 及 cos56-rcΔUL44 (图 2b)。两种重组粘粒均寄存于大肠杆菌 DH5 α 株 (MAX EFFICIENCY DH5 α , GIBCO#18258-012) 中。含有此两个重组粘粒的菌株已于 1998 年 9 月 24 日保存于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心，登记入册编号为 CGMCC No. 0361-1, 2。

将 cos6-rcΔUL2 与 cos14, cos28, cos48, cos56 组合称为 Set H(图 2a); 将 cos56-rcΔUL44 与 cos6, cos14, cos28, cos48 组合称为 Set I(图 2b)。按 Set H 和 Set I 的 5 个粘粒等摩尔混合，用 PacI 酶切去 cos 骨架。用脂质体共转染 BHK-21 细胞，5 个 HSV-1 片段在细胞内发生同源重组而产生 HSV-rc 重组病毒：5 天后细胞开始出现病变，待细胞完全病变后收培养液上清，2000 r/min 离心 5min，上清分装保存于 -20 ℃。将 Set H 粘粒产生的重组 HSV-rc 命名为 HSV1-rc/ΔUL2 (附图 1a) 和将 Set I 粘粒产生的重组 HSV-rc 命名 HSV1-rc/ΔUL44 (附图 1b)。用该方法产生的含有目的 DNA 片段的重组 HSV-1 病毒的概率达 50~100%。通过空斑筛选很容易获得纯一的重组病毒。

以下实施例对本发明的用于重组腺伴随病毒生产的全功能辅助病毒的制备和用途作了详细说明，但并不意味着限制本发明的内容。

实施例 1 粘粒 DNA 的制备

参照 Molecular Cloning --A Laboratory Manual , 2nd ed.(Sambrook J. et al, 1986) 用碱裂解法大量制备质粒 DNA 的方法提取粘粒 DNA，用聚乙二醇沉淀法纯化。

实施例 2 重组 HSV-rc 的制备

分别将 Set H(cos6-rcΔUL2 与 cos14, cos28, cos48, cos56) 和 Set I(cos56-rcΔUL44 与 cos6, cos14, cos28, cos48) 的 5 个粘粒等摩尔混合，用 PacI 酶切去 cos 骨架(不必分离去除)，用酚、酚/氯仿(1:1) 和氯仿各抽提一次，吸取上清，用 2.5 倍无水乙醇沉淀 DNA。用 lipofactamine (GIBCO BRL)20ul 与 10 ug DNA 按产品说明书共转染 80 % 铺满的 BHK-21 细胞 (约 2×10^6) 细胞，5 个 HSV-1 片段将在细胞内发生同源重组而产生 HSV-rc 重组病毒。转染 24h 后换用含 2 % FBS 的 1640 培养液 37 ℃ 培养，每天换液一次。5 天后细胞开始出现病变，待细胞完全病变后收培养液上清，2000 r/min 离心 5min，上清分装保存于 -20 ℃。将 SetH 粘粒产生的重组

说 明 书

HSV-rc 命名为 HSV1-rc/ΔUL2，将 SstI 粘粒产生的重组 HSV-rc 命名 HSV1-rc/ΔUL44。对获得的重组病毒进行两次空斑纯化，可得到纯一的 HSV1-rc/ΔUL2 和 HSV1-rc/ΔUL44。

实施例 3 293c18/pEBUF5 细胞株的建立

在 pBDZ(+)质粒（中国专利申请号 97116981.0）的基础上构建成含有 GFP 基因的重组质粒 pEBUF5。其结构见附图 3。将该质粒用脂质体方法导入 293c18 细胞（ATCC CRL10852，F9766），用 Hygromycin B 200ug/ml 选择培养 10-15d，获得的抗性细胞株命名为 293c18/EBUF5。

实施例 4 用 HSV-rc 感染 pAAV-GFP 转染的细胞制备 rAAV-GFP

用这种重组 HSV1 病毒感染含有报告基因 GFP（绿色荧光蛋白基因）的 rAAV 载体质粒转染的细胞，细胞病变(36-72h)后反复冻融 4 次裂解细胞以释放细胞中的 rAAV-GFP，低速离心去除细胞碎片，取上清 56℃灭活 30min，用于感染培养的哺乳动物细胞。

实施例 6 用 HSV-rc 感染 293c18/pEBUF5 细胞株制备 rAAV-GFP

用 0.5~5moi 的 HSV1-rc 病毒感染稳定携带 rAAV 载体质粒 pEBUF5 的细胞株 293c18/EBUF5，24~48h 后细胞发生完全病变，将细胞和其培养液一起反复冻融 4 次，1000r/min 离心 5min，上清中即含有大量的 rAAV-GFP 病毒。用这种方法可方便地产生大量有感染性的 rAAV/GFP 病毒，并可实现 rAAV 病毒批量生产。

实施例 7 rAAV 病毒转导培养细胞

取 rAAV-GFP 病毒上清 1ml 加入培养的 BHK 细胞（80% 铺满）中，24~48h 后在荧光显微镜下（激发光波长 490nm）观察，可见到大量的绿色细胞。表明产生的 rAAV 病毒具有感染性，并能将外源基因导入细胞中表达。

说 明 书 附 图

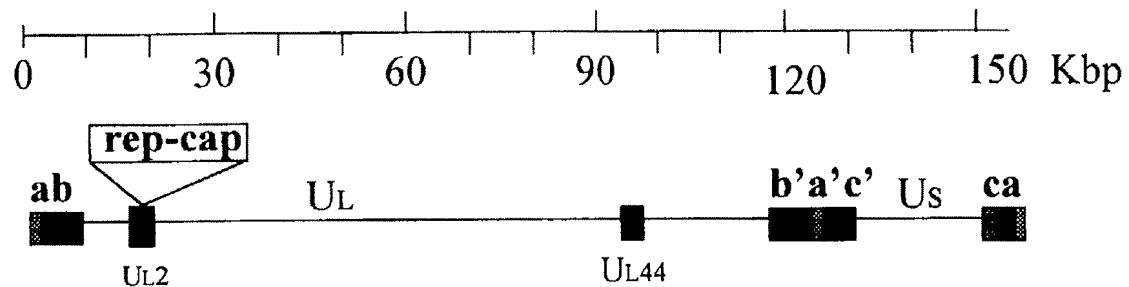


图1a 重组病毒HSV 1-rc/ΔUL2的基因组结构示意图

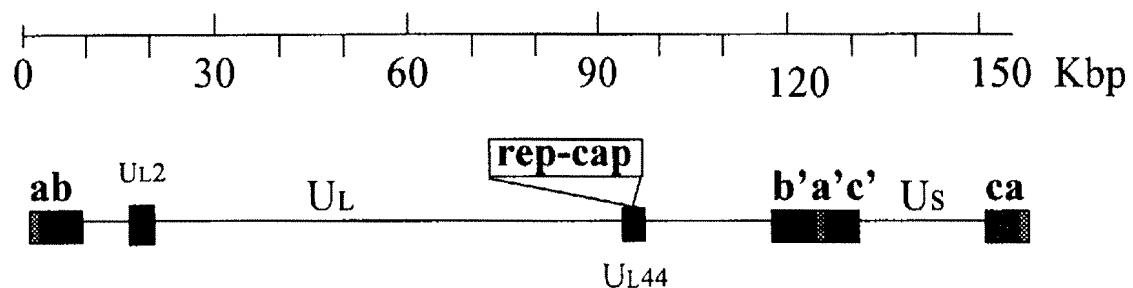


图1b 重组病毒HSV 1-rc/ΔUL44的基因组结构示意图

说 明 书 附 图

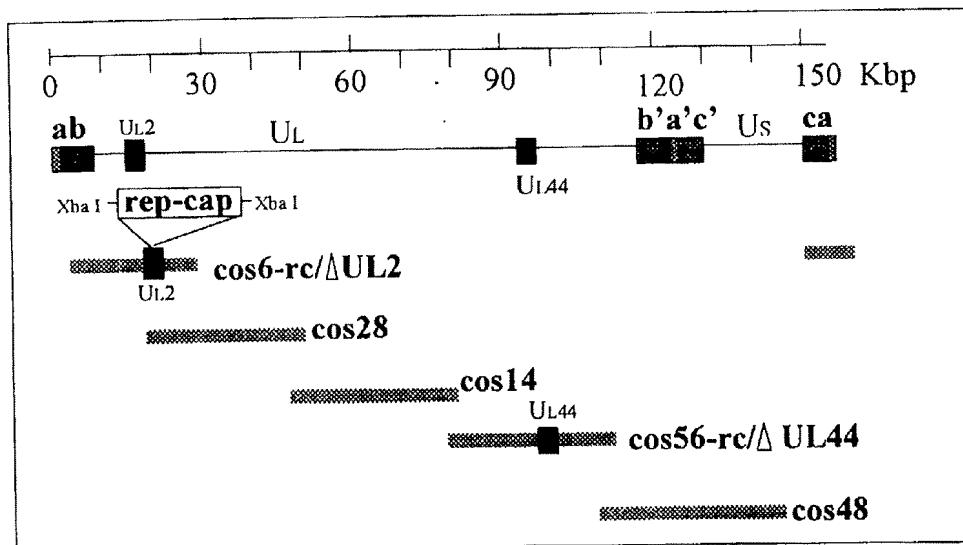


图2a cos6-rc/ΔUL2的结构及Set H粘粒组合

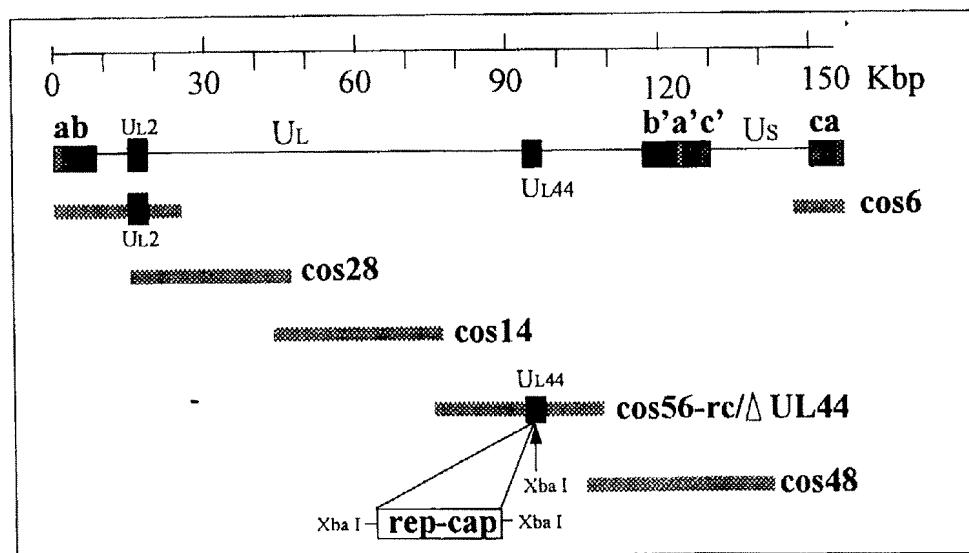


图2b cos56-rc/ΔUL44的结构及Set I粘粒组合

说 明 书 附 图

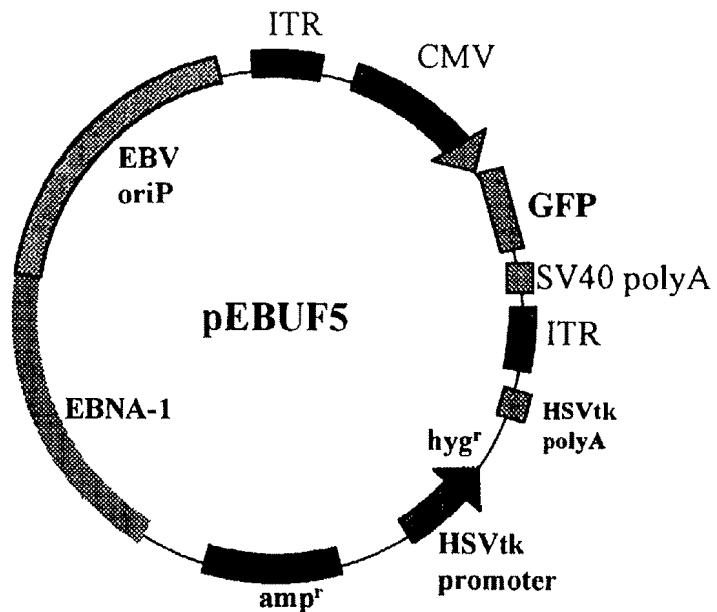


图3 pEBUF5的结构示意图